

〔研究ノート〕

# キノアおよびヒエ穀部の抗アレルギー活性の探索

高尾哲也・本尾友紀

## Anti-allergic Activity of Husked Quinoa and Japanese Millet

Tetsuya TAKAO and Yuki MOTOO

A model of intestinal epithelium was made using Caco-2 cells and RBL-2 H 3 cells. Water extracts of husked quinoa and japanese millet were added respectively to the mucosal epithelium side of the Caco-2 cells. The histamine release and the expression of  $TNF-\alpha$  in the RBL-2 H 3 cells were assayed. The quinoa and the japanese millet extracts significantly reduced the histamine release from the RBL-2 H 3 cells. Similarly, the expression of  $TNF-\alpha$  in both cases showed a tendency to decrease.

*Key words:* anti-allergic activity (抗アレルギー活性), histamine release (ヒスタミン遊離),  $TNF-\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ), husked quinoa (キノア穀部), husked japanese millet (ヒエ穀部)

### 1. 緒 言

環境条件の悪化や生活様式の変化、社会生活の複雑化にともなうストレスの増加等により、花粉症や食物アレルギーなどの免疫性疾患が子供から成人に及ぶ広い年代層で増加し、現代病のひとつとして注目されている。また、同様にクローン病やリウマチなどの炎症性免疫性疾患に悩む人も多い。

そこで、伝統的に栽培されているキノア<sup>1)</sup>およびヒエを用いて、アレルギーと炎症に関与するヒスタミン遊離量および  $TNF-\alpha$ , IL3, IL13 の発現量を検討した。

### 2. 方 法

#### (1) 試料の調製

##### ① キノア抽出物

キノア穀部全粒は市販品を入手した。キノアの穀部を粉砕した後、10% エタノールにより 20 時間抽出後、不要物を遠心分離 (10,000 g×15 分) により取り除き、濃縮後、凍結乾燥により粉末を得、キノア抽出物とした。

##### ② ヒエ抽出物

ヒエの穀部全粒は市販品を入手した。ヒエの穀部を粉砕した後、10% エタノールにより 20 時間抽出後、不要物を遠心分離 (10,000 g×15 分) により取り除き、濃縮後、凍結乾燥により粉末を得、ヒエ抽出物とした。

#### (2) 細胞の培養

##### ① Caco-2 細胞

腸管上皮細胞のモデルとして Caco-2 を使用した<sup>2)</sup>。Caco-2 細胞は MEM 培地 (SIGMA 社製) に 10% となるよう牛血清を添加し、37°C, 5% 二酸化炭素環境下で角形フラスコを用いて培養を行った。培養後細胞を取得し、24 穴プレート用バイオカルチャーコートインサート (BD BioCoat 社製) に、各インサート  $2.0 \times 10^5$  個となるよう播種し、21 日間、10% 牛血清添加 MEM 培地にて 37°C, 5% 二酸化炭素環境下で培養した<sup>3)</sup>。21 日間培養後、各インサートの細胞膜抵抗を EVOM2 (World Precision Instruments 社製) により測定し、400  $\Omega$  以上のインサートを使用した。

## ② RBL-2H3 細胞

肥満細胞のモデルとして RBL-2H3 を使用した<sup>4)</sup>。RBL-2H3 細胞は MEM 培地に 10% となるよう牛血清を添加し、37℃、5% 二酸化炭素環境下で角形フラスコを用いて前培養を行った。培養後細胞を取得し、DNP-IgE で感作後、24 穴プレートに、各穴  $5 \times 10^5$  個となるよう播種し、18 時間、10% 牛血清添加 MEM 培地にて、37℃、5% 二酸化炭素環境下で培養した。

## (3) 統計処理

平均および標準偏差を算出すると共に、Stat view ver. 5.0 を使用し Tukey-Kramer 法を用いて検定処理を行った。

## (4) 試料の添加

インサートで培養した Caco-2 細胞および、RBL-2H3 細胞の培地を廃棄し、PBS (リン酸緩衝液) にて洗浄した。洗浄後 24 穴プレートに PBS を添加した。添加後、インサートと 24 穴プレートをセットした。セット後、インサートに PBS に溶解したキノア穀部抽出物 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{穴}$ )、ヒエ抽出物 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{穴}$ ) を添加した。同時に PBS のみを添加した対照群を用意した。各試料添加後、37℃、5% 二酸化炭素環境下で 1 時間処理を行った。処理後、24 穴プレートに DNP-BSA を添加し、1 時間、37℃、5% 二酸化炭素環境下で刺激処理を行った。刺激処

理後、24 穴プレートの PBS および RBL-2H3 細胞を取得した。

## (5) ヒスタミン遊離量の測定

ヒスタミン遊離量の測定は取得した PBS を用いて EIA 法により行った。測定は 24 穴プレートより取得した PBS を適宜希釈し、HISTAMINE ENZYME IMMUNOASSAY KIT A05890-96 wells (SPIbio 社製) を使用して測定した。

## (6) サイトカイン類産生量の測定

IL3, IL13 および TNF- $\alpha$  の発現量の測定は、取得した RBL-2H3 細胞を用いて RT-PCR 法により行った。すなわち刺激後に取得した RBL-2H3 細胞を PBS により洗浄後、トリゾル (インビトロジェン社製) を 0.5 ml 添加した。添加後クロロフォルムを 0.1 ml 添加し混合後、遠心分離およびイソプロパノール沈殿し、エタノール洗浄により totalRNA を取得した。その後、RNase を含まない純水に溶解した。溶解後、ランダムプライマー法により、SuoerScripIII (インビトロジェン社製) を用いて逆転写を行い、cDNA を取得した。取得した cDNA を用いて、表 1 に示した条件で PCR を行った。PCR 処理後、PCR 産物の量を蛍光キャピラリー電気泳動 (バイオアナライザー 2100, アジレント社製) により測定し、 $\beta$ -actin をベースとした TNF- $\alpha$  および IL3, IL13 の産生量を算出した。

表 1 PCR の条件

	denaturation		annealing		extension		cycles	primer
	℃	sec.	℃	sec.	℃	sec.		
IL-3	94	60	54	45	72	45	30	GTATGCTGCTCCCGCTCCTGATG CATTCCACG GTCATAGGGCGAAAG
IL-13	94	60	52	45	72	45	30	GCTCTCGCTTGCCCTTGGTGGTC CATCCGAGGCCTTTTGGTTACAG
TNF- $\alpha$	94	60	49	45	72	45	30	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA CGGACTCCGTGATGTCTAAG
$\beta$ -actin	94	60	45	45	72	45	25	TAACCAACTGGGACGATATG ATACAGGGACAGCACAGCCT

### 3. 結果および考察

ヒスタミン遊離量を図1に示した。抽出物を添加しないPBSではヒスタミン遊離量は $86.4 \pm 8.8$  nM, キノア抽出物添加では $40.1 \pm 14.5$  nM, ヒエ抽出物添加では $53.3 \pm 8.0$  nMであった。キノア抽出物およびヒエ抽出物添加では, PBSに比べヒスタミン遊離量は有意に低値を示した。キノア抽出物およびヒエ抽出物添加の間では有意な差を認めなかった。

キノア抽出物およびヒエ抽出物添加によるヒスタミン遊離の阻害率を図2に示した。キノア抽出物はPBSに比べ $53.6 \pm 16.8\%$  ヒスタミン遊離を阻害した。同様にヒエ抽出物は $38.3 \pm 9.2\%$  阻害した。キノア抽出物とヒエ抽出物添加の間に有意な差を認めなかった。

TNF- $\alpha$  および IL3, IL13 の発現量を図3, 4, 5に示した。totalRNA 1  $\mu$ g 当たりの  $\beta$ -actin 量は各試料間で有意な差は認められなかった。キノア抽出物およびヒエ抽出物添加による TNF- $\alpha$  および IL3, IL13 の発現量は低値を示す傾向であったが, 有意な差は認められなかった。

以上の様に, 多孔膜上に培養した Caco2 細胞および RBL-2H3 により腸管上皮モデルを構築した。培養した Caco2 粘膜上皮側にキノアおよびヒエの抽出物を添加したところ, 無添加の状態に比べ, IgE で感作しアレルゲンで刺激した RBL-2H3 からのヒスタミン遊離量は有意に低値を示した。同様に RBL-2H3 の TNF- $\alpha$  および IL3, IL13 の発現量は低値を示す傾向にあった。

ヒスタミンは H1 受容体を介して炎症や血圧降下, 血管透過性亢進, 平滑筋収縮, 血管拡張などのアレルギー反応を生じる<sup>5)</sup>。同様に炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  は TNFRs 受容体を介してアポトーシスの誘導や感染防御, 抗腫瘍作用を示すが, 過剰発現によりクローン病やリュウマチの原因となっている<sup>6)</sup>。近年, TNF- $\alpha$  の抗体や受容体アンタゴニストがリュウマチなどの治療薬として利用されている。本研究ではキノア抽出物およびヒエ抽出物の添加により, ヒスタミン遊離量は低下し, TNF- $\alpha$  発現量も低下傾向にあった。このことから, これら

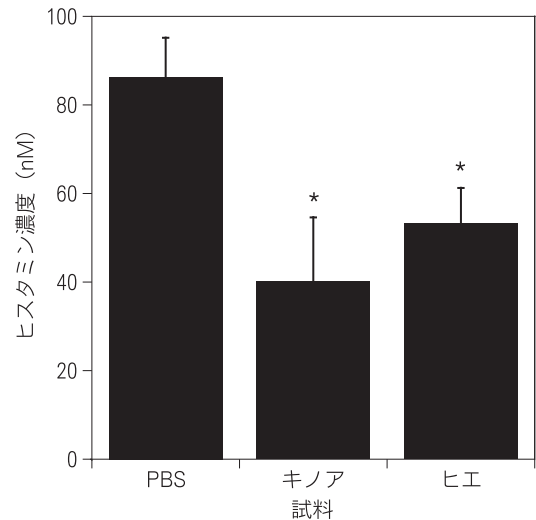


図1 キノアおよびヒエ抽出物添加時のヒスタミン遊離量  
平均±標準偏差, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$

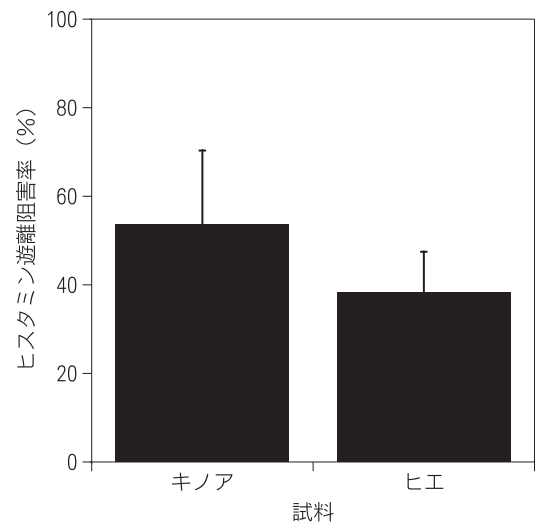


図2 キノアおよびヒエ抽出物添加時のヒスタミン遊離阻害率  
平均±標準偏差, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$

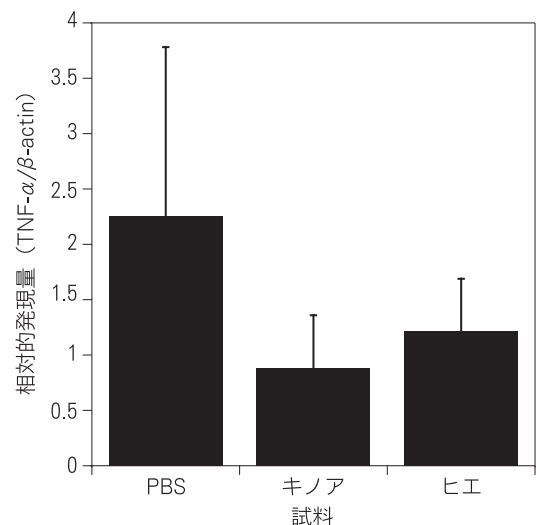


図3 キノアおよびヒエ抽出物添加時の TNF- $\alpha$  産生量  
平均±標準偏差, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

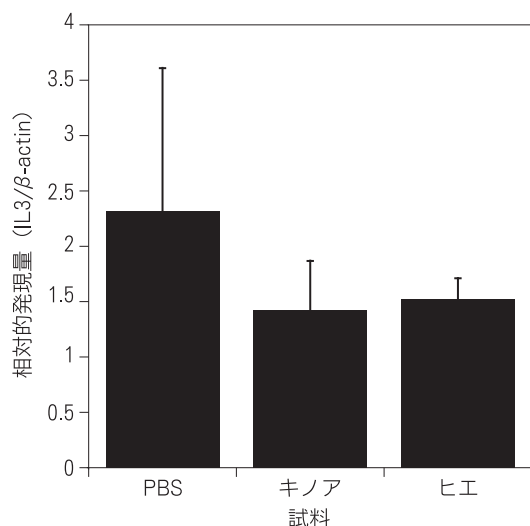


図4 キノアおよびヒエ抽出物添加時のIL3産生量  
平均±標準偏差, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

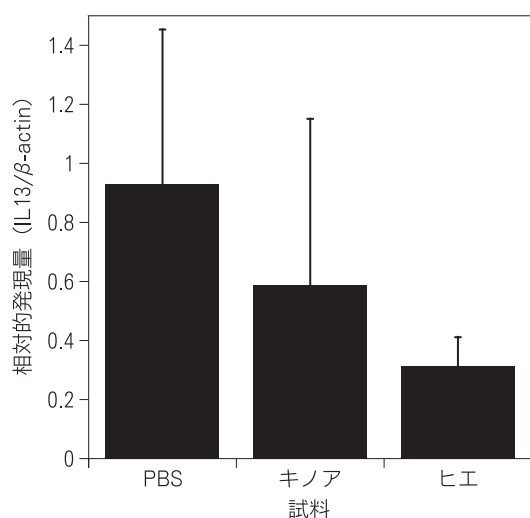


図5 キノアおよびヒエ抽出物添加時のIL13産生量  
平均±標準偏差, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

の抽出物は、経口投与によりアレルギー症状の発現を抑制する可能性を有することが示唆される。伝統的に栽培されているキノアやヒエは、長年食用に供されており、安全性の高い栽培植物として利用されてきている。今後分画、精製による活性物質の同定や、動物・ヒト試験により抗アレルギーや抗炎症性を明らかにし、これらの機能を有する食品素材として開発が可能であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Coulter L. and Lorenz K., Quinoa-Composition, nutritional value, food applications., *Lebensm-*

*Wiss. Technol.*, **23**, p 203-207, 1990

- 2) Rousset M., The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochem.*, **68**, p 1035-1040, 1986
- 3) Oguchi S., Walker W.A., and Sanderson IR., Differentiation and polarity alter the binding of IGF-I to human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, **20**, p 148-155, 1995
- 4) Matsubara M. et. al., Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells., *Biochem. Pharm.*, **67**, p 1315-1326, 2004
- 5) 渡邊建彦, 谷内一彦, 大津浩, ヒスタミンと創薬, 日本薬理学雑誌, **106**, p 14-19, 1995
- 6) 庄田宏文, 全身性自己免疫疾患の発症要因をめぐって 関節炎の発症とサイトカイン・ケモカイン, 月刊臨床免疫・アレルギー科, **47**, p 539-544, 2007

(たかお てつや 健康デザイン学科)

(もとお ゆき 管理栄養学科)